

# **EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE PLATA EN ENSAYOS (ECO) TOXICOLÓGICOS IN VITRO.**

*EVALUATION OF ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF SILVER SPECIES IN (ECO)  
TOXICOLOGICAL TESTS IN VITRO*

---

## **Trabajo de Fin de Grado**

Autora: Alejandra Sierra Caravaca

Dirigido por: Francisco Carlos Laborda García

Departamento de Química Analítica

Facultad de Ciencias

Curso 2019/2020

# ÍNDICE

1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Plata .....	3
2.2 ICP-MS .....	3
2.2.1 Detección de nanopartículas individuales (single particle ICP-MS).....	5
2.2.2 Detección de células individuales (single cell ICP-MS) .....	5
3. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	6
3.1 Digestión ácida.....	7
3.1.1 Aparatos .....	8
3.1.2 Material y reactivos .....	8
3.1.3 Procedimiento.....	8
3.1.4 Comparación de diferentes procedimientos experimentales.....	10
3.2 Digestión alcalina.....	12
3.2.1 Aparatos .....	12
3.2.2 Material y reactivos .....	12
3.2.3 Procedimiento.....	13
3.2.4 Comparación de diferentes procedimientos experimentales.....	14
3.3 Digestión enzimática .....	15
3.3.1 Aparatos .....	15
3.3.2 Material y reactivos .....	16
3.3.3 Procedimiento.....	16
3.3.4 Comparación de diferentes procedimientos experimentales.....	17
3.3.5 Digestión con lisozima .....	18
3.3.5.1 Aparatos .....	19
3.3.5.2 Material y reactivos .....	19
3.3.5.3 Procedimiento.....	19
4. COMPARACIÓN DE DIGESTIONES .....	20
4.1 Digestión alcalina vs digestión ácida.....	20
4.2 Digestión alcalina vs digestión enzimática .....	21
5. CONCLUSIÓN.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA .....	23

## Resumen

La plata tiene diversas aplicaciones médicas debido a su toxicidad relativamente baja en humanos y continúa la investigación sobre su potencial clínico. Las nanopartículas de plata, AgNPs, son uno de los nanomateriales más utilizados en productos de consumo, por lo que se plantean dudas sobre la seguridad de las mismas sobre los organismos vivos.

La creciente demanda para obtener información analítica tanto química como física sobre las AgNPs requiere de técnicas capaces de determinar y cuantificar AgNPs en muestras biológicas, además de poder obtener información sobre las posibles transformaciones que éstas pueden sufrir, así como de las diferentes especies de plata presentes en las muestras.

Para ello en este trabajo se han estudiado diferentes procedimientos de preparación de muestras que permitan obtener esa información acerca de las AgNPs y de especies derivadas de las mismas. Se han estudiado y analizado tres tipos diferentes: digestión ácida, digestión alcalina y digestión enzimática. De cada tipo de digestión, se exponen varios procedimientos diferentes para poder mostrar las diferentes posibilidades que existen.

## **Abstract**

Silver has several medical applications due to its relatively low toxicity in humans, research on its clinical potential continuous. Silver nanoparticles, AgNPs, are one of the most used nanomaterials in consumer goods, so doubts about their safety on living organism are raised.

The increase demand to obtain both chemical and physical analytical information on AgNPs requires techniques capable of determining and quantifying AgNPs in biological samples. Besides being able to obtain information on the possible transformation than these can undergo, as well as the different species of silver present in the samples.

So that, in this work different samples preparation procedures have been studied in order to obtain this information about AgNPs and species derived from them. Three different types have been studied and analysed: acid digestion, alkaline digestion and enzymatic digestion. For each type, different procedures are explained, in order to show the different existing possibilities.

## **1. OBJETIVOS**

En este Trabajo de Final de Grado, TFG, se plantea el estudio de forma bibliográfica de distintas estrategias de preparación de muestras y la determinación de distintas formas de plata en matrices biológicas procedentes de estudios microbiológicos.

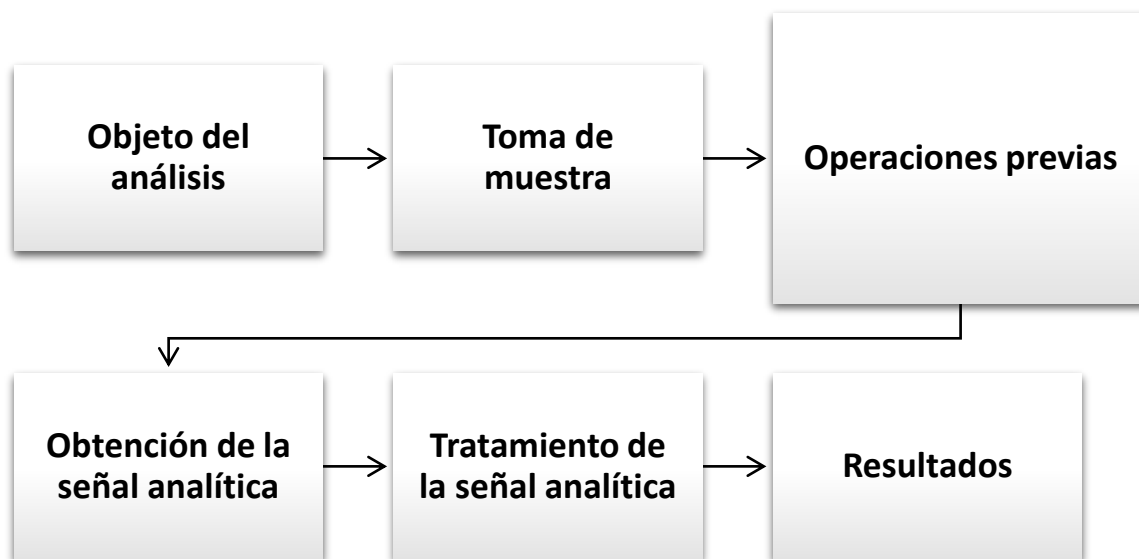
Además se desarrollarán competencias generales y se integrarán conocimientos y habilidades adquiridas a lo largo de toda la titulación, especialmente aquellos relacionados con la Química Analítica, a través de las siguientes tareas:

- Búsqueda de información sobre el tema, especialmente, mediante el manejo de bases de datos y de publicaciones científicas.
- Uso de los conocimientos adquiridos durante el grado.
- Organización y revisión del material recopilado.
- Elaboración de una memoria detallada de las distintas estrategias analíticas disponibles para la determinación de especies de plata en muestras procedentes de ensayos eco toxicológicos in vitro.

## 2. INTRODUCCIÓN

Cuando se analiza un objeto se tiene como finalidad obtener la información deseada acerca de ese objeto o sustancia de objeto. Dicha sustancia puede ser sólida, líquida, gaseosa o material biológico, por lo que la información obtenida dependerá del tipo de sustancia que sea, de su composición química o física y de sus propiedades estructurales o superficiales. Por lo que es importante encontrar una técnica analítica que se adapte a las necesidades de cada estudio.<sup>1</sup>

En la mayoría de los casos, para poder obtener un resultado analítico es necesario el desarrollo de un proceso analítico que se define como “el conjunto ordenado de operaciones que conducen del objeto del análisis a los resultados”. El tipo y número de operaciones requeridas para cada proceso varía de unos a otros, pero de forma general, se pueden distinguir las siguientes etapas<sup>2</sup>:



En cada etapa se pueden producir errores que serán acumulativos, por ello, el mejor proceso analítico será el que tenga menos operaciones y en el que se requiera menor tiempo. Todas las etapas tienen la misma importancia, “diciéndose que un resultado es tan malo como la etapa peor realizada del proceso analítico”.<sup>2</sup>

La etapa de operaciones previas suele ser imprescindible ya que muy pocas muestras están en condiciones de ser analizadas directamente. Dentro de esta etapa se pueden realizar diferentes operaciones siendo las más frecuentes: medir una alícuota de la muestra analítica, llevar la alícuota al estado físico deseado, adecuar la sensibilidad, resolución de las interferencias, derivatizar al analito y optimizar otras variables como el pH.<sup>2</sup>

La preparación de la muestra principalmente depende de las técnicas analíticas que se van a emplear y sus capacidades. Muchas determinaciones de metales son en cantidades muy pequeñas o trazas, y una forma de determinarlas es con la técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).<sup>1</sup>

Al igual que la alícuota es sometida a una serie de operaciones para estar en condiciones óptimas, el instrumento también debe someterse a operaciones como la calibración periódica, la optimización de las variables instrumentales que inciden en la señal analítica y la obtención de la curva de calibrado.<sup>2</sup>

Nos vamos a centrar en la determinación de plata en matrices biológicas, tanto en el contenido de plata total como de las distintas formas fisicoquímicas de plata, concretamente en formas disueltas y nanopartículas.

## 2.1 Plata

Durante muchos años la plata ha sido considerada como un metal precioso, pero hoy en día tiene un gran uso en la industria, como por ejemplo nanopartículas de plata (AgNP) en envases de alimentos. Los nanomateriales y la nanotecnología son campos en continuo crecimiento y afectan a muchos aspectos de nuestras vidas. El aumento de la producción de nanopartículas (NP) se puede observar en una mayor exposición humana, y a su vez trae preguntas acerca de la seguridad de estas nanopartículas en organismos vivos, principalmente cuando la exposición es a largo plazo.<sup>3</sup>

El ion plata ( $\text{Ag}^+$ ) tiene efectos tóxicos en muchos patógenos, incluidas bacterias, virus y hongos, sin embargo, en los seres humanos la toxicidad es relativamente baja, por ello es utilizada en varias aplicaciones. A su vez la actividad antibacteriana de los AgNP también depende de los iones de  $\text{Ag}^+$ , ya que se forman fácilmente en la superficie debido a la oxidación de la plata por el oxígeno. La actividad antibacteriana de los AgNP aumenta al decrecer el tamaño de partícula, que se ha asociado con la creciente relación superficie-masa. Actualmente muchos estudios in vitro e in vivo intentan averiguar la toxicidad/seguridad de estas nanopartículas, además de su biodistribución en órganos internos y sangre. La toxicidad puede estar relacionada con varias propiedades de las nanopartículas como el tamaño, química superficial, estado de agregación y solubilidad entre otras.<sup>3, 4</sup>

## 2.2 ICP-MS

Varias técnicas instrumentales son capaces de determinar bajas concentraciones de plata, pero la más efectiva es la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo, ICP-MS, ya que proporciona bajos límites de detección. Además el hecho de que las señales medidas en ICP-MS no correspondan a un elemento sino a un isótopo de éste, amplían las posibilidades de esta técnica atómica a análisis isotópico permitiendo determinar relaciones isotópicas y medir ambos isótopos naturales de la plata a la vez,  $\text{Ag}^{107}$  y  $\text{Ag}^{109}$ .<sup>3,5</sup>

Las posibles interferencias espectrales del isótopo  $\text{Ag}^{107}$  son Ar – Ga, Ar – Zn, Ar – Ge, Zr – O, Sr – O e Y – O y del isótopo  $\text{Ag}^{109}$  son Ar – Ga, Ar – Ge, Nb – O, Zr – O y Mo – O. Si se tiene conocimiento de la presencia de alguna de estas especies en la muestra, por ejemplo la interferencia Ar-Zn en tejidos animales puede influir en la medición, se puede reducir usando una celda de colisión/reacción en el ICP-MS o utilizando un instrumento de ICP-MS de alta resolución.<sup>3</sup>

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento tiene varios compartimentos fundamentales: sistema de introducción de muestras, plasma de acoplamiento inductivo (ICP), óptica iónica, analizador de masas y detector. Las muestras principalmente se introducen en estado líquido mediante un sistema de nebulización que da lugar a un aerosol. Estas gotas son introducidas dentro del plasma donde el disolvente se evapora y las partículas que quedan se volatilizan, atomizan e ionizan posteriormente. A través de la interfaz son extraídos los iones al espectrómetro de masas, donde se separan según su relación masa/carga y se detectan.<sup>6</sup>

Se trata de una técnica que proporciona un análisis elemental rápido a concentraciones bajas (ng/L), permitiendo medir elementos a nivel de trazas en fluidos biológicos. La ventaja más significativa del ICP-MS frente a otras técnicas es su capacidad de realizar un análisis multielemental, que permite medir varios elementos de forma simultánea.<sup>7</sup>

La sensibilidad del analito está relacionada con su ionización en el plasma, pero también con la abundancia isotópica del isótopo que se va a analizar. El límite de detección está en el rango de ng-pg/L para la mayoría de elementos, ya que el límite de detección depende de: el elemento a analizar, el tipo de matriz biológica, el factor de dilución empleado durante la preparación de muestra, el diseño de la introducción de muestra del sistema, las condiciones de funcionamiento del instrumento y las señales de fondo.<sup>7</sup>

Al estudiar una técnica también se tienen que tener en cuenta sus desventajas. Por ejemplo el precio, siendo el ICP-MS un instrumento bastante caro, tanto el coste del equipo, el coste operativo (gas argón) como el coste de la instalación del laboratorio (aire acondicionado, filtros, tuberías...); por lo que muchas veces sale rentable solo a laboratorios de gran volumen, además se requieren múltiples gases de alta pureza y un personal con un alto nivel de experiencia y conocimiento sobre el instrumento.<sup>7</sup>

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo es una técnica común para la cuantificación absoluta de la captación celular de nanopartículas de un metal u óxido metálico, ya que ofrece alta sensibilidad y selectividad para el análisis elemental. En los análisis rutinarios se requiere que las células antes de ser analizadas se sometan al proceso de lisis celular. Esta técnica solo proporciona la cantidad total del metal en particular, pero no permite diferenciar entre partículas individuales o especies iónicas diferentes. Tampoco da información sobre el tamaño de las partículas. Esto provoca que haya poca información acerca del número de NP por célula o de su heterogeneidad. Por lo que se están realizando modificaciones al ICP-MS para permitir solucionar estos inconvenientes, realizando el análisis individualizado de células (single cell, (SC-ICP-MS)) o partículas (single particle, (SP-ICP-MS)).<sup>4</sup>

Para poder determinar plata en muestras biológicas hay que tener en cuenta la estabilidad de las disoluciones de plata, ya que se producen frecuentemente pérdidas debido a la formación de coloides y reacciones de precipitación. El material de envase, el pH, la luz y la temperatura de almacenamiento juegan un papel importante en la estabilidad de las muestras. A bajas concentraciones de ácido nítrico, la plata no es estable. Además hay que prestar atención a la presencia de cloruros al preparar la muestra, ya que si su concentración no es lo suficientemente alta para desplazar el equilibrio, la plata precipitaría fácilmente.<sup>3</sup>



### **2.2.1 Detección de nanopartículas individuales (single particle ICP-MS)**

La técnica de SP-ICP-MS se obtiene al combinar los beneficios del ICP-MS con los de una técnica de conteo de partículas, porque las mediciones se realizan partícula por partícula. Puede abordar algunas de las propiedades más cruciales como el tamaño de partícula, el estado de agregación y la concentración del número de partículas.<sup>4, 8, 6</sup>

Sabiendo que las formas solubles de un elemento se distribuyen de forma homogénea dentro de una disolución, por lo tanto en las gotas del aerosol, se puede afirmar que el flujo del elemento que se introduce al plasma y luego viaja al detector en forma de iones se puede considerar constante, dando lugar a una señal constante durante la lectura. Así que la suspensión que se nebulice debe estar lo suficientemente diluida para que tenga ese comportamiento.<sup>6</sup>

Como se trabaja con frecuencias bajas (milisegundos o incluso microsegundos), los paquetes de iones se miden como pulsos, o como picos (señales transitorias) cuando se realizan varias medidas por NP si se mide en microsegundos. La intensidad de cada pulso se debe a los iones detectados de cada partícula. La suposición básica de esta técnica es que cada pulso registrado representa una sola partícula. De esta forma, la frecuencia de pulsos está relacionada directamente con la concentración numérica de partículas/agregados (número de partículas por volumen) y la intensidad del pulso, es decir la altura, con el tamaño de la partícula (la masa).<sup>4, 6</sup>

La SP-ICP-MS se está utilizando cada vez más, tanto para la cuantificación como para la caracterización (la distribución del tamaño de partícula) de AgNPs en matrices biológicas. Esto se debe a su ventaja principal de su capacidad para poder analizar un número elevado de partículas en un tiempo relativamente pequeño y también porque proporciona una distribución de tamaños de NP en función del número de partículas. Para poder limitar el error de muestreo de distribución de tamaño de partícula, se necesita un número mínimo de 500 AgNPs en la muestra. Cabe destacar que una limitación para analizar las NPs es que estas requieren un gran grado de dilución para poder ser analizadas y esto podría provocar alteraciones en los resultados en comparación con la muestra original.<sup>9, 10</sup>

### **2.2.2 Detección de células individuales (single cell ICP-MS)**

La detección individual de células es un campo de investigación importante para la toxicología debido al impacto que causan las NPs a nivel celular individual. Diferentes técnicas analíticas están siendo estudiadas para poder obtener resultados biológicos y toxicológicos, así como para poder obtener la información suficiente para comprender las interacciones existentes entre las NPs y las células.<sup>11</sup>

La mayoría de los métodos tradicionales realizan un análisis masivo a un gran número de células pero solo obtienen valores promedios de miles de células. Debido al poco conocimiento de las interacciones NPs-célula, cuesta encontrar una técnica capaz de determinar las células individualmente. Muchos estudios se centran en la detección de células individuales mediante ICP-MS (SC-ICP-MS) debido a que su preparación de muestras y su poder de proporcionar información sobre como varía una célula dentro de una población celular es sencilla.<sup>11</sup>

Para medir la intensidad de las nanopartículas de plata en suspensiones acuosas o células individuales y células digeridas, se utiliza el ICP-MS en un modo de análisis de resolución temporal. Como requisito principal para el análisis SC-ICP-MS es que solo debe ingresar una única célula al plasma en un intervalo de tiempo de integración determinado para cada célula. Así la intensidad de

la señal que se obtiene es proporcional a la cantidad de átomos de analito en una sola célula, y el número de picos de las señales es proporcional al número de células en disolución si se conoce la eficiencia del nebulizador.<sup>12, 13</sup>

Por otra parte, en condiciones óptimas, es una técnica que requiere de poca preparación de muestra; es sensible, selectiva, rápida y proporciona información inmediata sobre el contenido de AgNPs en células individuales. Sin embargo, presenta alguna limitación que hay que tener en cuenta. Está limitado por una única medición de isótopos y por la saturación del detector en un tiempo de integración bajo (0.1 ms) cuando se detectan casi 100 AgNPs por celda individual, por lo que no se puede utilizar para experimentos que contentan una dosis alta de AgNPs, simplemente por modo conteo. La determinación multielemental no es posible por SC-ICP-MS, y en ese caso se debería utilizar una citometría de masas para poder obtener más información del fenotipo celular y la biodistribución de las AgNPs.<sup>13</sup>

### **3. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Debido al uso extendido de nanopartículas en diferentes productos de consumo, hay una gran preocupación acerca del impacto o los efectos que puedan causar a los humanos debido a la exposición, ya sea por contacto dérmico, inhalación o ingestión, sobre todo en el caso de los alimentos que contienen NP sin proporcionar ninguna información acerca de sus efectos. Por ello se realizan estudios para detectar, caracterizar y cuantificar la plata y nanopartículas de plata en matrices biológicas a concentraciones realistas y estudiar el efecto que causan en ellas.<sup>14, 15</sup>

Las técnicas que se han estado utilizando hasta ahora para el estudio de nanopartículas son principalmente técnicas de dispersión de luz y microscopía electrónica, pero solo permiten estudiar matrices simples, y tienen limitaciones en el estudio de matrices ambientales y biológicas. Debido a que se redujeron los tiempos y se obtuvo una mejora en la frecuencia de adquisición de datos, el SP-ICP-MS es una de las técnicas más utilizadas para el estudio de NP en matrices biológicas.<sup>15,, 16</sup>

El análisis de NP ha provocado la adaptación de técnicas que ya existían así como el desarrollo de nuevas técnicas. La información analítica que se desea obtener es tanto la información química: la composición elemental o la concentración de masa, como el estado físico: el tamaño, la forma o la agregación. Además también hay que tener en cuenta las transformaciones que pueden sufrir las NP durante la preparación de muestras y ver si la técnica analítica es capaz de mostrar la información suficiente sobre las nuevas especies obtenidas.<sup>15, 16</sup>

Las nanopartículas poseen propiedades fisicoquímicas muy diferentes a las que posee su respectivo material a granel y esto se debe al tamaño de las NPs. A su vez, esto provoca cambios en su conductividad térmica, solubilidad, propiedades catalíticas u ópticas. Se ha estudiado que el cambio en la relación superficie-volumen/masa tiene la influencia más significativa en su comportamiento alterado. De forma que según va disminuyendo el tamaño de la partícula, aumenta la proporción de átomos en la superficie de la partícula, por lo que son las propiedades de la superficie las que determinan el comportamiento de las NPs.<sup>16</sup>

El procedimiento de preparación de muestra tiene que intentar evitar cualquier cambio en las propiedades de las NPs, principalmente el tamaño y la forma. Aunque el paso de preconcentración

no se puede evitar debido a que se están trabajando con concentraciones muy bajas de nanopartículas en las muestras. Al plantear los pasos a seguir en la preparación de muestras, debe seleccionarse de acuerdo con la matriz de muestras, las NPs a estudiar y la técnica disponible, ya que cualquier procedimiento al que se someta la muestra puede causar cambios en ella. Por ello, se debe asegurar y proporcionar la estabilidad de la muestra para poder obtener tanto las nanopartículas del metal como sus posibles iones disueltos, en este caso, AgNP y Ag<sup>+</sup>.<sup>14</sup>

Aparte de obtener la concentración o composición de las NPs, también se plantea el comportamiento de estas dentro del organismo vivo; por ejemplo se plantea, si las AgNPs pueden ser absorbidas por la circulación sistemática y ser trasladadas a otros órganos. El llegar a comprender la respuesta biológica del cuerpo humano frente a la exposición de NPs y su translocación dentro del organismo es bastante complicado y requiere del conocimiento de la localización de las NPs en los niveles celular y subcelular.<sup>16</sup>

A continuación se va a estudiar diferentes tipos de digestiones para poner en disolución muestras biológicas que contengan plata. Las digestiones ácidas permiten obtener la concentración de plata total, en cambio, las digestiones alcalinas y enzimáticas permiten diferenciar entre la concentración de las AgNPs y la de la plata disuelta. Por otro lado, la digestión con lisoenzima puede diferenciar la cantidad de plata que se encuentra en el interior de la célula.<sup>16</sup>

Además se debe realizar una optimización de la concentración de la muestra a un tiempo de permanencia fijo antes de las digestiones, cuando la técnica que se utilice sea SP-ICP-MS, ya que si utilizamos concentraciones más altas de nanopartículas, la probabilidad de que dos NPs o más ingresen al plasma al mismo tiempo aumenta y esto podría ser la causa de que se detectaran dos NPs al mismo tiempo y únicamente se contabilizaran como una partícula.<sup>9</sup>

### 3.1 Digestión ácida

La digestión ácida de muestras biológicas permite determinar AgNPs y Ag<sup>+</sup> como concentraciones de plata totales. Además permite la descomposición de la materia orgánica.<sup>3</sup>

Se debe tener cuidado con la influencia de los iones cloruro en la recuperación de plata y por ello se realizó un experimento para poder verificarlo. Se prepararon tres muestras, la primera sin iones cloruro, la segunda y la tercera con la concentración de cloruros simulando la concentración que contiene las muestras de los tejidos que se quieren analizar, además a la tercera muestra se le añade ácido clorhídrico. Tras medir las tres muestras en el ICP-MS se observó que la recuperación de plata en la muestra dos es apenas del 64%, debido a que gran parte de los Cl<sup>-</sup> han precipitado con la plata, AgCl. En el caso de la muestra tres, el HCl provocó que el exceso de cloruros hiciera desplazar el equilibrio y así la plata formó complejos AgCl<sup>-2</sup><sub>3</sub>, dando lugar a una recuperación del 98.5%.<sup>3</sup>

Para poder obtener información sobre la eficiencia de la digestión se puede determinar la concentración de carbono residual (CCR) en la muestra después de la digestión ácida. La presencia de carbono puede mejorar la señal de aquellos elementos que tengan menor energía de ionización que el carbono, pero a su vez aumentan la contaminación del instrumento ICP-MS. En cambio, en ocasiones, una alta concentración de carbono puede provocar su deposición en los conos de muestreo que da lugar a una supresión de la señal.<sup>10</sup>

Además de controlar el CCR, también se debe tener en cuenta el ácido residual en las muestras después de realizar la digestión ácida. Estudios han demostrado que un alto contenido de ácido

puede reducir la señal en el ICP-MS. Así que se debe asegurar que el contenido de ácido es lo suficientemente alto para que pueda degradar la materia orgánica facilitando una descomposición casi completa pero sin ser tan alta que pueda causar perturbaciones en la señales o deterioro en el instrumento.<sup>10</sup>

### 3.1.1 Aparatos

La digestión ácida se puede realizar tanto en vasos abiertos como en vasos cerrados en microondas. Teóricamente se espera que la digestión asistida por microondas sea más efectiva que la digestión empleando vasos abiertos, aunque es más común utilizar recipientes abiertos para muestras celulares. El programa de microondas consta de varias etapas en las que se puede ir jugando con los diferentes parámetros, controlándolos, siendo eso su principal ventaja frente a los vasos abiertos. Además es capaz de realizar la digestión en periodos de tiempo pequeños ya que la velocidad de calentamiento y enfriamiento es bastante rápida.<sup>10</sup>

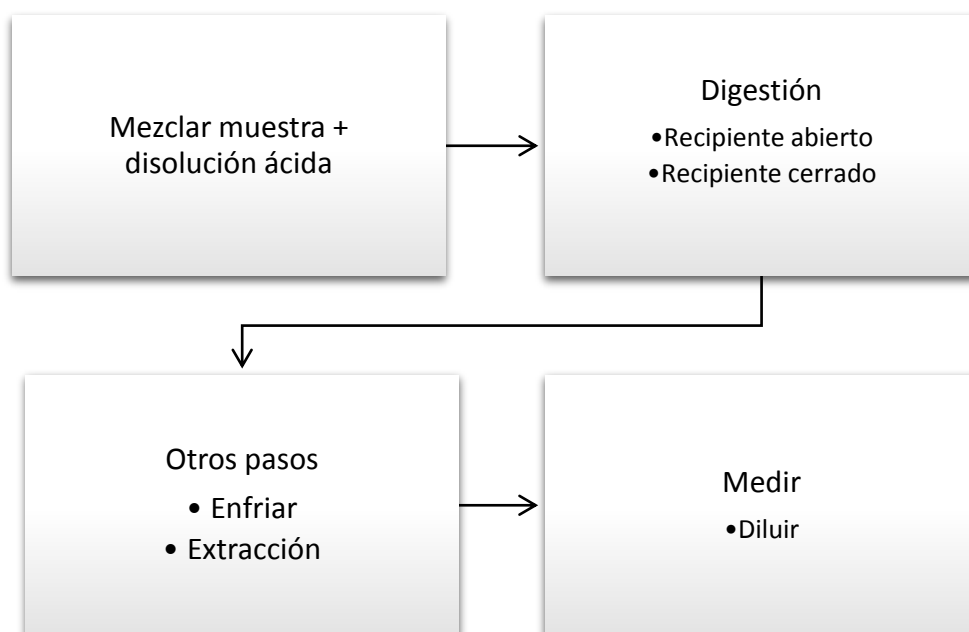
### 3.1.2 Material y reactivos

Para realizar la digestión ácida se necesita una disolución ácida que puede variar su composición. Puede ser de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{ClO}_4$  o una mezcla de ellos con diferentes porcentajes de composición.<sup>17, 10, 18</sup>

Otro reactivo que se emplea con frecuencia es el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) debido a su capacidad oxidante sobre la materia orgánica. Aunque varios estudios mostraron que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es estrictamente necesario ya que no influyó significativamente en las recuperaciones de plata. En cambio para muestras con diferentes composiciones y alto contenido de grasa, sí que puede ser útil para realizar una descomposición total.<sup>3</sup>

Es común que se utilice patrón interno para ayudar a la cuantificación de la plata. Dependiendo del analito a determinar, se utilizan diferentes patrones internos como por ejemplo indio (In) o rodio (Rh) para el caso de la plata.<sup>10, 18</sup>

### 3.1.3 Procedimiento



En primer lugar se mezcla la muestra con la disolución ácida elegida para cada tipo de muestra. A continuación se realiza la digestión ácida que puede ser en un recipiente abierto o asistida por microondas, donde eliges y programas los parámetros para que sean óptimos en cada caso. Cuando se trabaja en sistemas abiertos es obligatorio el uso de la campana extractora para eliminar los componentes volátiles. Después se pueden realizar diferentes procesos como añadir  $\text{H}_2\text{O}_2$  para ayudar a oxidar la materia orgánica, añadir patrón interno o dejar enfriar hasta temperatura ambiente, o incluso realizar varios pasos. Por último se diluye y se mide la muestra. <sup>18, 10, 17</sup>

### 3.1.4 Comparación de diferentes procedimientos experimentales

	Muestra	Cantidad de muestra	Acido	Recipiente para la digestión	Condiciones digestión	Enfriar	Campana extractora	H2O2	Diluir	Patrón interno	Referencia
<b>Procedimiento 1</b>	Mejillones y ostras	0,3 g	5 ml HNO3 @	Recipiente de teflón para un horno microondas	20 min a 6 atm	-	-	-	Hasta 20 ml con agua desionizada . Diluir 1:10 con HNO3 1%	In	[24]
<b>Procedimiento 2</b>	Mejillones y ostras	0,3 g	5 ml HCl + 3,5 ml HNO3	Recipiente de teflón para un horno microondas	20 min a 6 atm	-	-	-	Hasta 20 ml con agua desionizada	In	[24]
<b>Procedimiento 3</b>	Muestras celulares	25 µL	490 µL HNO3 + 10 µL HCl	Microondas	1,5 h a 180°C	Hasta temperatura ambiente	1 h	-	Diluir 10 veces con la mezcla de ácido	3 g/L Rh	[10]
<b>Procedimiento 4</b>	Muestras celulares	100 µL, evaporada por sequedad	200 µL HNO3 65%	Vaso abierto	6 h a temperatura ambiente		-	50 ml H2O2 30%, toda la noche a temperatura ambiente	650 µL ácido mixto (0,65% HNO3/0,10 % HCl). Se diluye 20 veces con la mezcla de ácido	3 g/L Rh	[10]
<b>Procedimiento 5</b>	Moluscos de bivalvos	1 g	4 ml agua ultrapura + 3 ml HNO3 65%	Recipientes de teflón para microondas	23 min a 1000W	2 h, hasta temperatura ambiente	-	1 ml H2O2 33%	Hasta 25 ml con agua ultrapura	-	[17]
<b>Procedimiento 6</b>	Células	50 mg/L	10 ml HNO3:HCl (7:3)	Placa agitadora	18 h en ligera agitación 50 rpm	-	-	-	Con HCl 3% hasta 50 ml	-	[25]

En la tabla podemos observar seis procedimientos diferentes de digestiones ácidas para determinar NPs en matrices biológicas.

En los procedimientos 1 y 2 se utiliza la misma muestra (mejillones y ostras) y el mismo procedimiento cambiando solamente la disolución ácida. En el procedimiento 1 se mezclan 0.3 g de tejido con 5 ml de  $\text{HNO}_3$  mientras que en el procedimiento 2 se mezclan 0.3 g de tejido con 5 ml de  $\text{HCl}$  y 3.5 ml de  $\text{HNO}_3$ . Después tiene lugar la digestión en un recipiente de teflón en un horno microondas durante 20 min a una presión de 6 atmosferas. A continuación se diluye el digestato con agua desionizada hasta un volumen total de 20 ml. Para poder medir la muestra en ICP-MS, se vuelve a diluir en una proporción de 1:10 con  $\text{HNO}_3$  al 1%. También se añade indio como patrón interno.<sup>18</sup>

En el procedimiento 2 se observó que se obtenían mejores recuperaciones, usando una calefacción de convención durante 16 horas, en lugar de un calentamiento de microondas de 20 minutos. De esta forma la digestión es más efectiva utilizando la mezcla de ácidos  $\text{HCl}$  y  $\text{HNO}_3$  para la determinación de plata.<sup>18</sup>

Los procedimientos 3 y 4 utilizan la misma muestra (muestras celulares) comparando los dos métodos de digestión ácida, con vaso abierto y con microondas.<sup>10</sup>

El procedimiento 3 utiliza el microondas, donde mezcla 25  $\mu\text{L}$  de muestra con 490  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  y 10  $\mu\text{L}$   $\text{HCl}$ . El programa de microondas utilizado mantenía la temperatura fija en 180°C mientras variaba la potencia y consta de cuatro etapas<sup>10</sup>:

- 1ª Rampa: De 0 a 200W en 30 min.
- Etapa de espera: A 200W durante 10 min.
- 2ª Rampa: De 200 a 400 W en 20 min.
- Etapa de espera: A 400 W durante 20 min.

Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó en una campana extractora durante 1 hora para que se evaporasen los gases formados en la digestión ( $\text{NO}$ ,  $\text{CO}_2$ ). Por último se diluye 10 veces con una mezcla ácida. También se añade 3g/L de Rh como patrón interno.<sup>10</sup>

En el procedimiento 4 se añaden 100  $\mu\text{L}$  de muestra de células lisadas que son evaporadas al vacío con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  al 65%. Se mezcla usando un torbellino y después se realiza la digestión en un recipiente abierto durante 6 h a temperatura ambiente. Se añade 50 ml de  $\text{HNO}_3$  al 30% y se dejó toda la noche a temperatura ambiente digiriendo. A continuación se añaden 650  $\mu\text{L}$  de ácido mixto ( $\text{HNO}_3$  65% /  $\text{HCl}$  10%). Por último se diluye 20 veces con la mezcla de ácido. Al igual que en el experimento 3, se añaden 3 g/L de Rh como patrón interno.<sup>10</sup>

En el procedimiento 5 se utiliza moluscos de bivalvos de muestra, de la cual se mezcla 1 g con 4 ml de agua ultra pura, 3 ml de  $\text{HNO}_3$  al 69% y 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33%. Se realiza una digestión asistida por microondas, con un programa que mantiene la potencia a 1000W durante sus cuatro etapas<sup>17</sup>:

- 1ª Rampa: Calentar de temperatura ambiente a 90°C en 2 min.
- 2ª Rampa: Calentar de 90°C a 140°C en 5 min.
- 3ª Rampa: Calentar de 140°C a 200°C en 5 min.
- Etapa de calentamiento: A 200°C durante 11 min.

Después se enfrió a temperatura ambiente durante unas 2 h. Por último se diluyó con 25 ml de agua ultra pura y en este caso no se empleó patrón interno.<sup>17</sup>

En el procedimiento 6 se mezclan 50 mg/l de muestra de células con 10 ml de una disolución de  $\text{HNO}_3$ :  $\text{HCl}$  (7:3). A continuación se dejó agitando 18 horas en una agitación ligera a 50 rpm en una placa agitadora para que tuviera lugar la digestión ácida. Por último se diluye hasta 50 ml con  $\text{HCl}$  al 3%.<sup>19</sup>

### 3.2 Digestión alcalina

Como estrategia alternativa a la digestión ácida, pero manteniendo la integridad de las nanopartículas de plata, se establece la digestión alcalina que permite obtener concentraciones de  $\text{Ag}^+$  y AgNPs.<sup>19</sup>

En algunos casos se puede utilizar un acomplejante que permita mantener a la plata en disolución, como por ejemplo la cisteína. La cisteína ayuda a estabilizar la plata ya que forma complejos con ella ( $\log K' = 11.9$ ). Este ligando permite disminuir la concentración de  $\text{Ag}^+$  libre en el medio, por lo que, ya no se tiene en cuenta esa concentración en la toxicidad total, solamente contribuiría la concentración de las AgNPs. Pero en este caso, puede ser que la cisteína tenga un efecto negativo ya que al facilitar el proceso de oxidación debido a la formación de complejos con la  $\text{Ag}^+$  liberada, dificulte la identificación de las AgNPs. Esta hipótesis ha sido estudiada de forma visual utilizando el color amarillo de la suspensión de AgNPs. Se observó que la disolución mantenía su color cuando solo estaba en contacto con TMAH, pero lo perdía si se añadía cisteína a la disolución, por lo que se llegó a la conclusión que la cisteína favorecía la disolución de nanopartículas de plata. Además también se comprobó que cuanto mayor cantidad de cisteína se añadía, más se acelera el proceso de oxidación.<sup>19</sup>

#### 3.2.1 Aparatos

Para homogenizar los tejidos biológicos antes de la digestión se emplea un homogeneizador, manual o automático. Para la digestión alcalina se utiliza una sonda de ultrasonido, o en el caso de realizar la digestión por agitación se emplea un agitador mecánico. Para el control del pH se emplea un medidor de pH. En algunos casos se realiza una rotación y para ella se emplea un rotador mecánico.<sup>9,</sup>

<sup>19, 20, 21, 22</sup>

#### 3.2.2 Material y reactivos

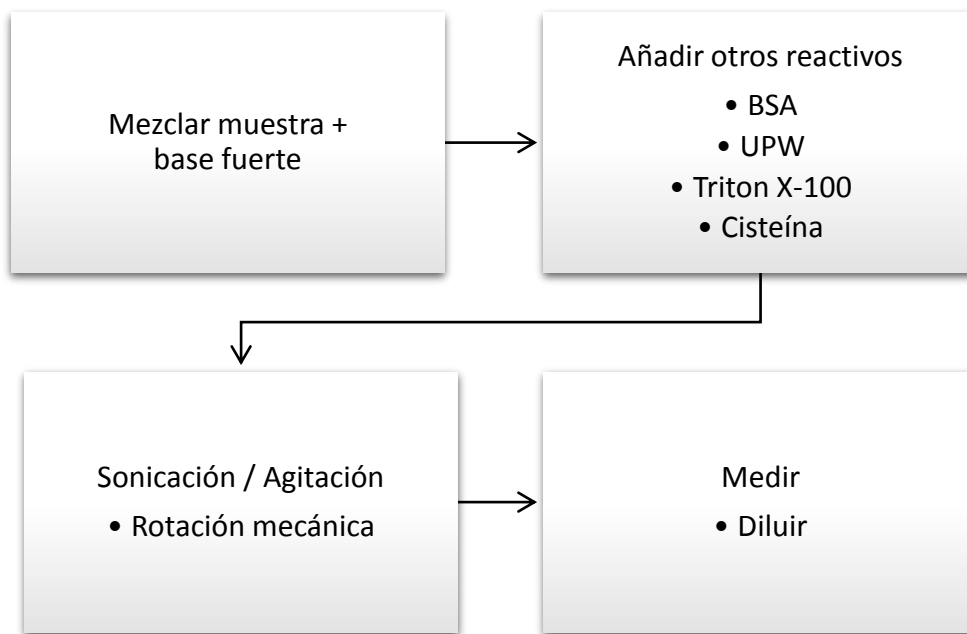
Como base fuerte se emplea principalmente hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) que manteniendo la integridad de las nanopartículas es capaz de producir la precipitación de la plata. Además, es capaz de provocar las rupturas hidrolíticas y la metilación de ésteres, amidas y algunos éteres, solubilizando la materia orgánica.<sup>19</sup>

Dependiendo del procedimiento a realizar, se utilizan diferentes reactivos. A veces se utiliza BSA, albumina de suero bovino, y se emplea de proteína modelo ya que es casi idéntica en estructura, función y transiciones dependientes del pH con las proteínas humanas. Al añadir BSA se forma una monocapa de proteína sobre las NPs a concentraciones similares a las que se encuentran en la sangre humana.<sup>9, 21</sup>



Otras veces se diluye en agua ultra pura, UPW. También se puede utilizar un tensioactivo, como el Triton X-100, para promover la nebulización y evitar la adhesión de la muestra a las paredes del nebulizador.<sup>19, 20, 22</sup>

### 3.2.3 Procedimiento



El procedimiento que sigue la digestión alcalina es muy simple. Primero se mezcla la muestra con la base fuerte, principalmente TMAH. Se puede añadir diferentes reactivos según el efecto que se quiera tener, si se quiere conseguir una monocapa alrededor de las AgNPs se añadirá BSA, si se quiere utilizar un tensioactivo se añadirá Triton X-100, también se puede diluir la muestra con UPW o añadir cisteína. Algunos reactivos se añaden antes de realizar la digestión como el Triton X-100 o el UPW, o bien después de la digestión como el BSA. A continuación se realiza la digestión bien por una sonicación o por una agitación, después también puede someterse a una rotación mecánica para completar la digestión. Por último se diluye y se mide.<sup>9, 19, 20, 21, 22</sup>

### 3.2.4 Comparación de diferentes procedimientos experimentales

	Muestra	Cantidad de muestra	Base fuerte	Condiciones digestión	Reactivos	Rotación mecánica	Diluir	Referencia
<b>Procedimiento 1</b>	Bazo de rata	200 µL	TMAH 5% (v/v)	Sonicación 1 h a temperatura ambiente	BSA después de la digestión	Temperatura ambiente, toda la noche	-	[9]
<b>Procedimiento 2</b>	Tejido húmedo	0,1 g	2 ml TMAH 25% (v/v)	Sonicación 1 h a temperatura ambiente	0,3 ml UPW antes de la digestión	Temperatura ambiente, 23 h	Con UPW 20 veces para conseguir TMAH al 1% (v/v)	[26]
<b>Procedimiento 3</b>	Células	50 mg/L	4 ml TMAH 25% (v/v)	Agitación durante 4 horas	1 ml Triton X-100 antes de la digestión	-	Con Triton X-100 al 0,05% hasta 8 ml	[25]
<b>Procedimiento 4</b>	Muestras biológicas de tejidos	75 mg	1 ml TMAH 50% (v/v)	Se disuelve durante 12 horas a temperatura ambiente	Ácido nítrico y Triton X-100, se almacena 72 horas a -20°C	-	-	[28]
<b>Procedimiento 5</b>	Hígado de cerdo	0,2 g	4 ml TMAH 10%	Agitación 6 horas a temperatura ambiente, 300 rpm	-	-	Se diluye 10 veces	[27]

En el procedimiento 1, como tratamiento previo de la muestra, se sometió al bazo de rata a la sonicación durante 1 hora para homogeneizar. A continuación se mezcló 200 µL de muestra con TMAH hasta obtener una concentración final de la base fuerte del 5% (v/v). Después se añadió la concentración suficiente de BSA (300 moléculas/ NPs) para que permita la formación de una monocapa de BSA. La muestra, con un volumen total de 2ml, se sometió a la sonicación durante 1 hora a temperatura ambiente para realizar la digestión alcalina. Por último, se rotó mecánicamente durante toda la noche a temperatura ambiente. <sup>9</sup>

En el procedimiento 2 se utilizó una muestra de mayor peso, 0.1 g de tejido húmedo. Se añadió 2 ml de TMAH 25% (v/v) y 0.3 ml de UPW para diluir y obtener una concentración final de TMAH del 20% (v/v). A continuación se introdujo en el baño de sonicación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se sometió a una rotación mecánica durante 23 horas a temperatura ambiente. Por último se diluyó con UPW 20 veces para conseguir una concentración final de TMAH del 1% (v/v).<sup>20</sup>

En el procedimiento 3 se añade 4 ml de TMAH 25% (v/v) y 1 ml de Triton X-100 0.25%. Se agitó la muestra durante 4 horas para que se produjera la digestión. Después se cogen 2 ml de muestra y se diluye hasta 8 ml con Triton X-100 al 0.05%. Así se obtiene un medio final de TMAH al 5% y Triton X-100 al 0.05%.

En el procedimiento 4, 75 mg de muestras biológicas de tejidos se disuelven con 1 ml de TMAH 50% (v/v) durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación se mezcla con una disolución formada por ácido nítrico y Triton X-100 y se almacena durante 72 horas a -20°C.<sup>22</sup>

En el procedimiento 5 se mezcló 0.2 g de hígado de cerdo homogeneizado con 4 ml de TMAH al 10% (v/v) y se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente y 300 rpm. Los extractos alcalinos de hígado se diluyeron 10 veces, antes de ser medidos.<sup>21</sup>

### **3.3 Digestión enzimática**

Las digestiones enzimáticas son una de las opciones para poder aislar AgNPs en matrices biológicas. Se trata de un método bastante atractivo ya que trabaja a temperaturas y pH moderado, lo que permite una mayor facilidad de operación. Debido a que las AgNPs pueden sufrir reacciones con oxígeno molecular o con especies reducidas de azufre y cloro, para la preparación de la muestra se utiliza una técnica más suave que es la hidrólisis enzimática.<sup>17, 23</sup>

Pueden utilizarse diferentes enzimas dependiendo del coste o del objetivo final. La más común es la proteasa K que es proteolíticamente activa en un rango de pH de 7.5-12. Según el proveedor de cada enzima suele indicar el pH recomendado para obtener la máxima estabilidad durante el almacenamiento. Las enzimas pancreatina y lipasa también ofrecen una mayor actividad cuando se opera a pH fisiológico. Otra opción es utilizar Macerozyme R-10, se trata de una mezcla múltiple de enzimas cuyos componentes son celulosa (0.1 unidad/mg), hemicelulosa (0.25 unidad/mg) y pectinasa (0.5 unidad/mg), que es capaz de digerir los tejidos vegetales.<sup>17, 9, 24</sup>

También se investigaron tres enzimas digestivas: tripsina, colagenasa y papaína, que son capaces de disociar los tejidos y tienen un coste menor que la proteinasa K. De este estudio se concluyó que de las tres enzimas, la tripsina fue la que ofreció una mayor eficiencia a la concentración más baja una vez realizada la digestión. Además de que demuestra claramente que la enzima tripsina no causa ningún daño en las muestras biológicas por lo que se seleccionó para otros posibles experimentos.<sup>25</sup>

#### **3.3.1 Aparatos**

Para homogeneizar/moler los tejidos biológicos antes de la digestión se puede utilizar un homogeneizador, manual o automático. Se utiliza una sonda de ultrasonido para la asistencia de hidrólisis enzimática y una centrifugadora para la eliminación de sólidos. El ajuste de pH se consigue con un medidor de pH. También se utiliza una estación de microondas con: recipientes de teflón

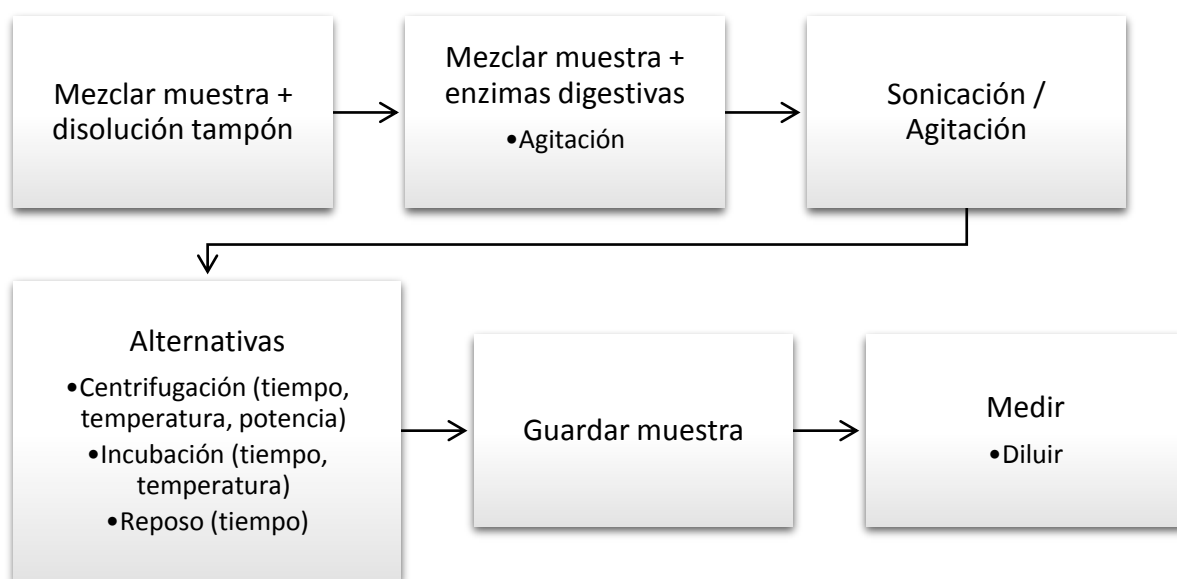
cerrados, placa adaptadora y resortes de seguridad que ayuden al procedimiento de la digestión. Además se utiliza un baño de agua con limpiador ultrasónico, donde se puede programar la temperatura y el tiempo, lo que permite dispersar las AgNPs en muestras y estándares antes de medirlas.<sup>17, 26</sup>

### 3.3.2 Material y reactivos

En primer lugar, para evitar la contaminación se lavaron y mantuvieron con ácido nítrico al 10% (v/v) durante 48 horas aproximadamente todo el material de vidrio y plástico y posteriormente este material se lavó varias veces con agua ultra pura.<sup>17</sup>

Las soluciones de plata se preparan a partir de soluciones de plata de 40-60 nm. Para el tratamiento enzimático se utiliza un tampón de digestión que puede tener diferente composición según recomienda el proveedor de la enzima, por ejemplo, disolución tampón formada por Tris 10 mM, SDS al 0,5% y acetato de calcio 1 mM cuando la enzima es proteinasa K,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  cuando la enzima es pancreatina y lipasa o citrato cuando la enzima es Macerozyme R-10.<sup>9, 17</sup>

### 3.3.3 Procedimiento



Las digestiones enzimáticas siguen la misma mecánica, pero hay veces que varía en algún paso para poder verificar si se consiguen mejores resultados. Primero se mezcla la muestra con la disolución tampón para obtener el pH adecuado. Se suele agitar para homogeneizar mientras se añade las enzimas digestivas. Se somete a la sonicación, en esta parte se puede jugar con la potencia, tiempo y temperatura para ayudar a la digestión. La sonicación suele tener lugar en un baño de hielo para evitar que se eleve mucho la temperatura. A veces en vez de la sonicación, tiene lugar una agitación con agitador mecánico. A partir de aquí, se pueden dar diferentes procesos como la centrifugación cuando quedan restos sin digerir, incubación o reposo, e incluso se pueden combinar varios procesos. Luego se guarda la muestra bajo las condiciones elegidas y por último se mide la muestra, que puede ser diluida antes de analizarla.<sup>9, 17, 23, 24, 27, 28</sup>

### 3.3.4 Comparación de diferentes procedimientos experimentales

	Muestra	Enzimas	pH	Disolución tampón	Volumen muestra	Volumen disolución tampón	Volumen de disolución de enzimas	Volumen total	Agitación	Sonicación	Centrifugación	Temperatura de guardar la muestra	Diluir	Referencia
<b>Procedimiento 01</b>	bazos de ratas	Proteasa k	8	Tris 10 mM, SDS al 0,5% y acetato de calcio 1 mM	100 µL	1,880 µL	20 ml (diluído 100 U/ml)	2 ml	10 s en agitador vórtex	1 h	-	Temperatura ambiente	-	[9]
<b>Procedimiento 02</b>	moluscos bivalvos	Pancreatina y lipasa	7,4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O 0,2M y NaOH 0,2M	1g	Hasta pH 7,4	10 ml (2g/L pancreatina + 2g/L lipasa)	~10 ml	-	10 min en baño de hielo, sonicación continua	25 min, 8°C, 3900 rpm	8 °C	-	[17]
<b>Procedimiento 03</b>	moluscos bivalvos	Pancreatina y lipasa	7,4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O 0,2M y NaOH 0,2M	1g	Hasta pH 7,4	7,5 ml (3mg/L pancreatina + 3g/L lipasa)	~7,5 ml	12 h, 37°C, 150 rpm, agitación continua (orbital-horizantal)	-	25 min, 8°C, 3900 rpm	-20	-	[17]
<b>Procedimiento 04</b>	plantas de tomate	Macerozima R-10	3,5-7	Citrato	Una pequeña cantidad	8 ml de 2mM	2 ml (1g polvo enzimático/ 20 ml agua ultrapura)	~10 ml	3 min	24 h, 37°C agitación con baño de agua	-	Temperatura ambiente	100 diluido con agua ultrapura	[19]
<b>Procedimiento 05</b>	carne de pollo	Proteasa k	9,5	Tris 10 mM, Tritón X-100 al 1% y acetato de calcio 1 mM	200 mg	4 ml	25 µL	~10 ml	1 min agitación vigorosa	5 min en baño de agua, 4W, sonicación de punta	-	Incubación 3 h a 35°C y se deja enfriar a temperatura ambiente	100 diluido con agua ultrapura	[18]
<b>Procedimiento 06</b>	surimi (palitos de cangrejo)	Pancreatina y lipasa	7,4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O 0,2M y NaOH 0,2M	1 g	Hasta pH 7,4	7,5 ml ( 0,8g pancreatina + 0,8g lipasa en 100ml)	~7,5 ml	12 h, 37°C, 200 rpm, agitación continua (orbital-horizantal)	-	10 min, 8°C, 3900 rpm	4°C	-	[23]

Dependiendo de la enzima utilizada, se debe conseguir un pH en concreto recomendado por el fabricante para obtener la máxima estabilidad durante el almacenamiento y utilizar una disolución tampón determinada, lo suele indicar el fabricante.

En el procedimiento 1 se utiliza la enzima más común, proteasa k. En primer lugar se mezcla la muestra y la disolución tampón correspondiente. A continuación se añade la disolución enzimática mientras se agita durante 10 segundos con un agitador vórtex. La muestra se sometió a la sonicación durante 1 hora y después se dejó rotando de manera mecánica toda la noche a temperatura ambiente. A temperatura ambiente, la actividad es al menos el 80% de la actividad máxima, que se logra a 37 ° C.<sup>9</sup>

En los procedimientos 2 y 3 se utiliza la misma disolución tampón y pH ya que se trata de la misma enzima. Se diferencia en los pasos que siguen. El procedimiento 2 realiza una digestión enzimática asistida por ultrasonido realizando una sonicación continua durante 10 minutos en un baño de hielo. Cuando el tiempo de sonicación es más pequeño (5 min) se obtienen concentraciones bajas de plata debido a una digestión incompleta, mientras que si el tiempo de sonicación es mayor (15 min) se produce un calentamiento excesivo que puede ser responsable de que empeore la eficiencia. Entretanto el procedimiento 3 realiza una digestión enzimática convencional y por ello realiza una agitación continua (orbital-horizontal) durante 12 horas a 37°C y 150 rpm. En ambos procedimientos se centrifuga para eliminar los residuos sólidos durante 25 minutos a 8°C y 3900 rpm. Otra diferencia de ambos experimentos es la temperatura a la que se guarda la muestra antes de ser analizada. En el procedimiento 2 se guarda a 8°C mientras que en el procedimiento 3 se guarda a -20°C.<sup>17</sup>

En el procedimiento 4 se utiliza la mezcla múltiple de enzimas denominada Macerozyme R-10. Se mezcla la muestra con la disolución tampón, y seguido con la disolución enzimática mientras es agitada unos 3 minutos. Luego tiene lugar la sonicación en baño de agua durante 24 horas a 37°C. Al finalizar, se reposa durante 1 hora a temperatura ambiente. Para poder medirla se diluyó 100 veces en agua ultra pura.<sup>24</sup>

En el procedimiento 5 se vuelve a utilizar la proteína proteasa K, pero con la diferencia de que en la disolución tampón se utiliza otro tenso activo que no es el SDS sino el Triton X-100 y el pH de trabajo es 9.5. Primero se mezcló la muestra y 4 ml del tampón de digestión mientras se agitó vigorosamente durante 1 minuto. A continuación se sometió al proceso de sonicación en un baño de agua durante 5 min a 4 W. Después de la sonicación es cuando se añaden 25 µL de proteinasa k. Seguido se incubó durante 3 hora a 35°C. Por último, se deja enfriar a temperatura ambiente y se diluye 100 veces para ser medido.<sup>23</sup>

El procedimiento 6 sigue la misma mecánica que el procedimiento 3, salvo que varía algunos valores como en la agitación en vez de ser 150 rpm son 200 rpm o la centrifugación en vez de durar 25 minutos dura 10 minutos. También la temperatura para guardar la muestra en vez de ser -20°C son 4°C.<sup>28</sup>

### **3.3.5 Digestión con lisoenzima**

Para poder estudiar la toxicidad que pueden producir las AgNPs en matrices biológicas, concretamente en células de bacterias, es importante entender si las AgNPs penetran en el interior de la célula o si se detienen en la superficie celular para causar el daño.<sup>29</sup>

Hasta ahora se han visto diferentes procedimientos basados en digestiones ácidas, alcalinas y enzimáticas para poder determinar la cantidad de plata total o la cantidad de  $\text{Ag}^+$  y de AgNPs. Pero ahora vamos a comentar un estudio que se realizó para poder separar cuantitativamente las AgNPs intracelulares de las extracelulares empleando una enzima llamada lisoenzima.<sup>29</sup>

El principal problema para determinar las AgNPs intracelular son las interferencias debido a las AgNPs que se han adsorbido en la superficie de la pared celular, ya que las bacterias a nivel de micras tienen una gran superficie específica de absorción de AgNPs. En algunos estudios han utilizado grupos funcionales específicos para poder eliminar estas interferencias acomplejando, pero no son capaces de eliminarlas por completo (ya que el proceso de formar complejos se trata de un proceso dinámico).<sup>29</sup>

La plata absorbida por la pared celular se puede calcular restando a la dosis de exposición total de Ag conocida los contenidos de Ag intracelular y extracelular.<sup>29</sup>

La estrategia que se lleva a cabo es la eliminación de la pared celular añadiendo lisoenzima y así poder determinar las AgNPs intracelulares. Las AgNPs extracelulares se refieren a las que se encuentran en el medio extracelular. La digestión que se va a realizar es una digestión alcalina empleando TMAH como base fuerte.<sup>29</sup>

### 3.3.5.1 Aparatos

Para poder separar la plata extracelular e intracelular se utiliza una centrifugadora, que permite diferenciar dos fases, el sobrenadante perteneciente a la plata extracelular y el sedimento perteneciente a la plata intracelular.<sup>29</sup>

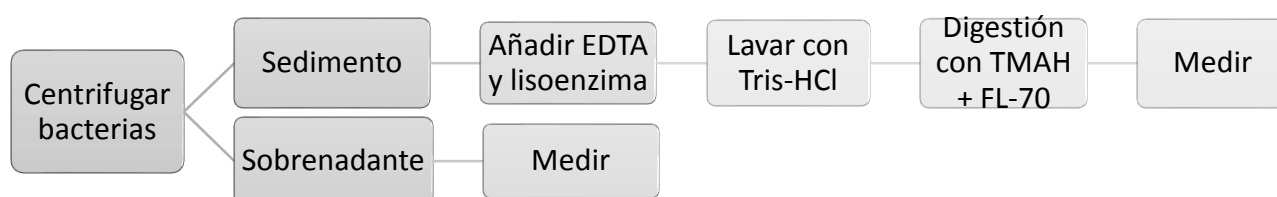
Para realizar la digestión alcalina se emplea un agitador. El pH se puede controlar con un medidor de pH.<sup>29</sup>

### 3.3.5.2 Material y reactivos

Como base fuerte para la digestión se emplea TMAH. La lisoenzima y el EDTA se emplean para eliminar la pared celular, pero manteniendo la integridad de la estructura celular del protoplasto. La mezcla de Tris-HCl se utiliza para lavar la muestra y eliminar los componentes de la pared celular que queden, y así eliminar las interferencias de la adsorción de las AgNPs a la pared celular.<sup>29</sup>

Para evitar que se produzca la disolución parcial de las AgNPs en  $\text{Ag}^+$ , se añade un surfactante FL-70 que es capaz de dispersar las AgNPs y prevenir su agregación o disolución. Las recuperaciones más altas se consiguen utilizando FL-70 al 5% (v/v).<sup>29</sup>

### 3.3.5.3 Procedimiento



En primer lugar, se centrifuga 1 ml de bacterias en un tubo de ensayo durante 20 minutos a 4°C y 3000g, para poder separar la plata extracelular de la intracelular. El sobrenadante pertenece a la plata extracelular y es medida por SEC-ICP-MS, mientras que el sedimento pertenece a la plata intracelular y se tiene que tratar para su determinación.<sup>29</sup>

Para poder eliminar la pared celular del sedimento se añaden EDTA y lisoenzima. Seguido se lava dos veces con Tris-HCl para poder eliminar el resto de componentes que quedan de la pared celular, y así poder eliminar la interferencia causada por la adsorción de la pared celular.<sup>29</sup>

A continuación se suspendió el protoplasto en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se sometió a una sonicación breve. Después se añadió 1 ml de FL-70 al 20 % (v/v) y 2 ml de TMAH al 15% y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y 200 rpm para dar lugar a la digestión de la muestra y extracción de plata. Por último se diluye con fase móvil y se mide por SEC-ICP-MS.<sup>29</sup>

## 4. COMPARACIÓN DE DIGESTIONES

### 4.1 Digestión alcalina vs digestión ácida

A continuación se va a comentar las diferencias que se observaron al comparar la digestión alcalina y la ácida. En este caso se va a comparar el procedimiento 6 de la digestión ácida y el procedimiento 3 de la digestión alcalina.<sup>19</sup>

En este estudio se realizaron dos tipos de cultivos, uno en el que la plata era añadida a las células en forma de AgNPs procedente del Colargol y otra en la que la plata se añadía en forma de Ag<sup>+</sup> procedente de AgNO<sub>3</sub>. Estos dos tipos de cultivos fueron sometidos tanto a la digestión alcalina como al ataque ácido. Los resultados obtenidos respecto a la concentración de plata son:<sup>19</sup>

Muestra	Concentración de plata/μg	
	Digestión con TMAH	Ataque ácido
<b>Células + Colargol 30 mg/L</b>	77,2 ± 9,9	75 ± 1
<b>Células + AgNO<sub>3</sub> 4 mg/L</b>	7,4 ± 1,1	6,76 ± 0,04

Se aplicó un test t con un nivel de confianza del 95% y se comprobó que no existían diferencias significativas entre la digestión alcalina y la digestión ácida ya que sus resultados son muy similares. Por lo que se puede afirmar que tanto el tratamiento con ácido como con TMAH permite de forma completa la puesta en disolución de la plata en las muestras de células.<sup>19</sup>

Además se puede afirmar que el tratamiento alcalino no tiene pérdidas significativas debidas a procesos de precipitación. Por lo que permite la cuantificación de plata en matrices biológicas a la vez que la identificación de formas metálicas de plata.<sup>19</sup>



## 4.2 Digestión alcalina vs digestión enzimática

Un estudio comparó la digestión alcalina y la digestión enzimática. En concreto, comparó el procedimiento 1 de la digestión alcalina y el procedimiento 1 de la digestión enzimática que se han comentado antes.<sup>9</sup>

En primer lugar se compara la distribución del tamaño de partícula (PSD) que se ha obtenido con ambos procedimientos para la muestra de bazo de rata. Los resultados obtenidos fueron que las PSD fueron similares en ambos casos por lo que la preparación de la muestra no tuvo efecto sobre la determinación del tamaño de las NPs. Para poder comparar las PSD se calcularon los percentiles.<sup>9</sup>

Otra comparación que se realizó fue respecto a la concentración de las NPs en los tejidos biológicos. Aparte de comparar ambos métodos, el alcalino y el enzimático por SP-ICP-MS, se realizó una digestión con agua regia determinada por ICP-MS convencional para tener un valor de referencia. La concentración obtenida de NPs tras la digestión enzimática fue  $1.287 \pm 594$  ng NPs / g de tejido del bazo y la concentración obtenida de NPs tras la digestión alcalina fue  $2.795 \pm 616$  ng NPs / g de tejido del bazo, mientras que el valor obtenido con la digestión de agua regia fue  $4021 \pm 904$  ng de Au / g de tejido del bazo. Al realizar la prueba t se observó que no hubo diferencias significativas entre el valor obtenido por la digestión alcalina (SP-ICP-MS) y la digestión con agua regia (ICP-MS convencional). En cambio, la concentración obtenida tras el tratamiento enzimático fue del 60% más bajo con respecto al alcalino.<sup>9</sup>

Por último, se comparó el número de partículas determinadas. Al realizar la prueba t se comprobó que no había diferencias significativas entre el número de partículas determinadas por el tratamiento alcalino y el de agua ultra pura. Por el contrario, el número de partículas en el caso de la digestión enzimática fue mucho menor, cuya explicación puede ser que en el caso del tratamiento enzimático las moléculas orgánicas pueden adherirse a la superficie de los tubos y a la cámara de pulverización actuando como trampas para las NPs.<sup>9</sup>

## 5. CONCLUSIÓN

En este Trabajo de Fin de Grado se han estudiado diferentes preparaciones de muestra para poder cuantificar diferentes especies de plata en matrices biológicas. Se han estudiado tres tipos de digestiones: ácida, alcalina, enzimática.

En primer lugar se ha estudiado la digestión ácida. Se encuentran mejores recuperaciones empleando una calefacción de convención más larga en lugar de microondas de calentamiento. Además los resultados obtenidos con una mezcla ácida de HCl + HNO<sub>3</sub> son mucho más próximos al valor original que si se emplea solo HNO<sub>3</sub>, por lo que se puede concluir que el procedimiento de digestión HCl + HNO<sub>3</sub> es efectivo para solubilizar concentraciones altas de Ag en los tejidos, en cambio, los procedimientos de digestión que solo utilizan HNO<sub>3</sub> producen resultados erróneos y no deben usarse para analizar Ag.

Otro factor que se estudió en la digestión ácida era el tipo de recipiente, si abierto o cerrado. Se comprobó que no había diferencias significativas entre ambos procedimientos.

En segundo lugar se ha estudiado la digestión alcalina. En cuanto al tiempo de digestión, se demostró que se obtenían mejores resultados en un tiempo de 1 a 6 horas, por lo que se determinó 6 horas como tiempo óptimo para la digestión. También se pudo concluir que el TMAH al 10% es el valor óptimo para la determinación de la plata.

En tercer lugar se ha estudiado la digestión enzimática. Se puede concluir que la digestión enzimática como puesta en disolución de matrices biológicas para poder determinar AgNPs se trata de un procedimiento rápido y seguro con respecto a la integridad de la distribución del tamaño de las AgNPs. Sin embargo, se ha demostrado que algunas enzimas como la pancreatina o lipasa interactúan con las AgNPs lo que provoca que disminuya de forma ligera la concentración obtenida de Ag por SP-ICP-MS.

Por último se estudió un caso particular, que era la digestión de la muestra empleando lisoenzima. Permite identificar y cuantificar diferentes especies de plata intracelulares, como las AgNP,  $\text{Ag}^+$  acomplexado y  $\text{Ag}^+$  libre. El estudio demostró que una pequeña cantidad de AgNP e iones  $\text{Ag}^+$  podrían tener acceso a las bacterias pero que la mayoría de  $\text{Ag}^+$  se quedaban unidos a la superficie celular. Por lo que este método proporciona una estrategia eficaz para poder explorar y estudiar el mecanismo de toxicidad de las nanopartículas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Steehler, J. K. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Somenath M.; Winefordner, J. D., Ed.; **2004**; Vol. 81. <https://doi.org/10.1021/ed081p199>.
- (2) Harvey, D *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer Heidelberg. **2011**.
- (3) Veverková, L.; Hradilová, Š.; Milde, D.; Panáček, A.; Skopalová, J.; Kvítek, L.; Petrželová, K.; Zbořil, R. Accurate Determination of Silver Nanoparticles in Animal Tissues by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2014**, *102*, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.10.002>.
- (4) Heather E. Pace, Nicola J. Rogers, Chad Jarolimek, Victoria A.Coleman, C. P. H. and J. F. R. Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Bone* **2008**, *23* (1), 18. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- (5) Skoog, D. A. *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning. **2008**
- (6) Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Analysis of Inorganic Engineered Nanoparticles in Environmental Samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2016**, *9*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001>.
- (7) Wilschefski, S. C.; Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin. Biochem. Rev.* **2019**, *40* (3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/aacb-19-00024>.
- (8) Hendriks, L.; Ramkorun-Schmidt, B.; Gundlach-Graham, A.; Koch, J.; Grass, R. N.; Jakubowski, N.; Günther, D. Single-Particle ICP-MS with Online Microdroplet Calibration: Toward Matrix Independent Nanoparticle Sizing. *J. Anal. At. Spectrom.* **2019**, *34* (4), 716–728. <https://doi.org/10.1039/c8ja00397a>.
- (9) Loeschner, K.; Brabrand, M. S. J.; Sloth, J. J.; Larsen, E. H. Use of Alkaline or Enzymatic Sample Pretreatment Prior to Characterization of Gold Nanoparticles in Animal Tissue by Single-Particle ICPMS Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (16), 3845–3851. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7431-y>.
- (10) Riisom, M.; Gammelgaard, B.; Lambert, I. H.; Stürup, S. Development and Validation of an ICP-MS Method for Quantification of Total Carbon and Platinum in Cell Samples and Comparison of Open-Vessel and Microwave-Assisted Acid Digestion Methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *158* (September), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.038>.
- (11) López-Serrano Oliver, A.; Baumgart, S.; Bremser, W.; Flemig, S.; Wittke, D.; Grützkau, A.; Luch, A.; Haase, A.; Jakubowski, N. Quantification of Silver Nanoparticles Taken up by Single Cells Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in the Single Cell Measurement Mode. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, *33* (7), 1256–1263. <https://doi.org/10.1039/c7ja00395a>.
- (12) Miyashita, S. I.; Groombridge, A. S.; Fujii, S. I.; Takatsu, A.; Chiba, K.; Inagaki, K. Time-Resolved ICP-MS Measurement: A New Method for Elemental and Multiparametric Analysis of Single

- Cells. *Anal. Sci.* **2014**, *30* (2), 219–224. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.219>.
- (13) Hsiao, I. L.; Bierkandt, F. S.; Reichardt, P.; Luch, A.; Huang, Y. J.; Jakubowski, N.; Tentschert, J.; Haase, A. Quantification and Visualization of Cellular Uptake of TiO<sub>2</sub> and Ag Nanoparticles: Comparison of Different ICP-MS Techniques. *J. Nanobiotechnology* **2016**, *14* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0203-z>.
  - (14) De la Calle, I.; Menta, M.; Séby, F. Current Trends and Challenges in Sample Preparation for Metallic Nanoparticles Analysis in Daily Products and Environmental Samples: A Review. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2016**, *125*, 66–96. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.09.007>.
  - (15) Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M. T.; Jiménez, M. S.; Pérez-Arantegui, J.; Castillo, J. R. Detection, Characterization and Quantification of Inorganic Engineered Nanomaterials: A Review of Techniques and Methodological Approaches for the Analysis of Complex Samples. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *904*, 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
  - (16) Gajdosechova, Z.; Mester, Z. Recent Trends in Analysis of Nanoparticles in Biological Matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (19), 4277–4292. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01620-9>.
  - (17) Taboada-López, M. V.; Alonso-Seijo, N.; Herbello-Hermelo, P.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. Determination and Characterization of Silver Nanoparticles in Bivalve Molluscs by Ultrasound Assisted Enzymatic Hydrolysis and Sp-ICP-MS. *Microchem. J.* **2019**, *148* (March), 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.023>.
  - (18) Daskalakis, K. D.; O'Connor, T. P.; Crecelius, E. A. Evaluation of Digestion Procedures for Determining Silver in Mussels and Oysters. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31* (8), 2303–2306. <https://doi.org/10.1021/es9608959>.
  - (19) Abad Álvaro, I. Desarrollo de una plataforma de métodos analíticos para el análisis de nanomateriales en sistemas medioambientales y biológicos, **2017**.
  - (20) Vidmar, J.; Buerki-Thurnherr, T.; Loeschner, K. Comparison of the Suitability of Alkaline or Enzymatic Sample Pre-Treatment for Characterization of Silver Nanoparticles in Human Tissue by Single Particle ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, *33* (5), 752–761. <https://doi.org/10.1039/c7ja00402h>.
  - (21) Dong, L.; Zhou, X.; Hu, L.; Yin, Y.; Liu, J. Simultaneous Size Characterization and Mass Quantification of the in Vivo Core-Biocrone Structure and Dissolved Species of Silver Nanoparticles. *J. Environ. Sci. (China)* **2018**, *63*, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.10.010>.
  - (22) Labat, L. La Préparation Des Matrices Biologiques Pour l'analyse Des Métaux. *Ann. Toxicol. Anal.* **2010**, *22* (2), 81–88. <https://doi.org/10.1051/ata/2010011>.
  - (23) Peters, R. J. B.; Rivera, Z. H.; Van Bommel, G.; Marvin, H. J. P.; Weigel, S.; Bouwmeester, H. Development and Validation of Single Particle ICP-MS for Sizing and Quantitative Determination of Nano-Silver in Chicken Meat Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (16), 3875–3885. <https://doi.org/10.1007/s00216->

013-7571-0.

- (24) Dan, Y.; Zhang, W.; Xue, R.; Ma, X.; Stephan, C.; Shi, H. Characterization of Gold Nanoparticle Uptake by Tomato Plants Using Enzymatic Extraction Followed by Single-Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (5), 3007–3014. <https://doi.org/10.1021/es506179e>.
- (25) Courtene-Jones, W.; Quinn, B.; Murphy, F.; Gary, S. F.; Narayanaswamy, B. E. Optimisation of Enzymatic Digestion and Validation of Specimen Preservation Methods for the Analysis of Ingested Microplastics. *Anal. Methods* **2017**, *9* (9), 1437–1445. <https://doi.org/10.1039/c6ay02343f>.
- (26) Taboada-López, M. V.; Iglesias-López, S.; Herbello-Hermelo, P.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. Ultrasound Assisted Enzymatic Hydrolysis for Isolating Titanium Dioxide Nanoparticles from Bivalve Mollusk before Sp-ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1018*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.075>.
- (27) Loeschner, K.; Navratilova, J.; Grombe, R.; Linsinger, T. P. J.; Købler, C.; Mølhave, K.; Larsen, E. H. In-House Validation of a Method for Determination of Silver Nanoparticles in Chicken Meat Based on Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. *Food Chem.* **2015**, *181*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.033>.
- (28) Taboada-López, M. V.; Herbello-Hermelo, P.; Domínguez-González, R.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. Enzymatic Hydrolysis as a Sample Pre-Treatment for Titanium Dioxide Nanoparticles Assessment in Surimi (Crab Sticks) by Single Particle ICP-MS. *Talanta* **2019**, *195* (September 2018), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.023>.
- (29) Dong, L. J.; Lai, Y. J.; Yu, S. J.; Liu, J. F. Speciation Analysis of the Uptake and Biodistribution of Nanoparticulate and Ionic Silver in Escherichia Coli. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (19), 12525–12530. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03359>.